

Fotos: Carlos Lopes



Diagnóstico de *Ralstonia solanacearum* em tomateiro

Carlos Alberto Lopes¹
Mauricio Rossato²

Introdução

O tomateiro é uma das plantas mais atacadas por doenças, a maioria delas de origem parasitária (ou biótica). O controle dessas doenças é normalmente complexo e deve ser buscado preferentemente de forma preventiva por meio da integração da resistência genética com medidas culturais. Para tal, é essencial o diagnóstico preciso da doença, visto que sintomas podem variar de acordo com a cultivar, com o ambiente onde a planta se desenvolve, com a variante do patógeno e com a idade da planta por ocasião da infecção.

Esta publicação, que versa sobre a murcha-bacteriana, causada por *Ralstonia solanacearum*, possibilitará estudantes e profissionais terem este patógeno manuseado de forma correta. Pretende-se, com ela, fornecer informações sobre os processos envolvidos na identificação da doença, coleta e envio de material para análise laboratorial, técnicas de identificação e armazenamento de cepas do patógeno.

Descrição do patógeno

Ralstonia solanacearum (Smith 1896) Yabuuchi et al. 1996, comb. nov. é uma versátil bactéria gram negativa habitante do solo, que ataca grande número de espécies vegetais pertencentes a mais de 50 famílias botânicas (HAYWARD, 1994). As espécies mais suscetíveis, entretanto, pertencem à família Solanaceae, que compreende, além do tomate, a batata, o pimentão, a berinjela, o jiló e o fumo. A não ser pela banana, onde causa o "Moko da bananeira", a doença causada por *R. solanacearum* é conhecida como murcha-bacteriana ou muchadeira.

Ralstonia solanacearum apresenta grande diversidade fenotípica, tradicionalmente traduzida em raças, com base na capacidade de atacar diferentes hospedeiras (BUDDENHAGEN et al., 1962), ou em biovars, com base na capacidade diferencial de usar certos açúcares e álcoois como fontes de carbono (HAYWARD, 1991). Mais recentemente, Fegan e Prior (2005), apoiados em estudos moleculares, solidificaram a ideia de que *R. solanacearum* é um complexo específico, e propuseram uma nova

¹ Eng. Agr., Ph.D. – Embrapa Hortaliças, Brasília, DF – carlos.lopes@embrapa.br

² Eng. Agr., M.Sc., – Universidade de Brasília (UnB), – mauricio.rossato@hotmail.com

classificação genética baseada em quatro níveis taxonômicos, equivalentes a espécies, subespécies, grupos infra-subespecíficos e linhagens clonais (Quadro 1). Nessa nova proposta, o termo “filotipo” é usado para designar grupos maiores no nível de subespécies, pelo uso de PCR multiplex, e o termo “sequevar” é usado para designar grupos infra-subespecíficos baseados no sequenciamento do gene de endoglucanase. No Brasil, o tomateiro é atacado principalmente pela raça 1 (biovars 1 e 3), referentes aos filotipos 2 e 1, respectivamente, da bactéria, embora haja também relatos também da raça 3 (biovar 2 e 2T), referente ao filotipo 2.

Descrição da doença

O sintoma mais típico da murcha-bacteriana é a murcha rápida da planta de cima para baixo. Em tomate, a doença se manifesta em qualquer estágio de desenvolvimento da planta, mas principalmente por ocasião da formação do primeiro cacho de frutos (Figura 1). Ao infectar a planta por ferimentos nas raízes, a bactéria se aloja nos vasos condutores de água (xilema). Daí, sob condições favoráveis (cultivar suscetível e ambiente quente e úmido), a bactéria se multiplica, produzindo alta população de células produtoras de polissacarídeos extracelulares viscosos, que acabam entupindo o xilema, que é o vaso que conduz a água absorvida pelas raízes para a parte aérea da planta. Por isso, as folhas murcham, começando pelo topo da planta, principalmente nas horas mais quentes do dia, podendo se recuperar à noite. Com o passar do tempo, toda a planta murcha de forma irreversível e morre. Em condições desfavoráveis à doença (clima frio ou seco, patógeno pouco virulento ou cultivar menos suscetível), os sintomas aparecem mais tardiamente, podendo ocorrer murcha um só lado da planta ou da folha, além de se observar



Foto: Carlos Lopes

Figura 1. Planta de tomate com murcha-bacteriana, apresentando murcha generalizada.

certo amarelecimento das folhas iniciando pelas mais velhas. Neste caso, é comum a murcha-bacteriana ser confundida com outras doenças vasculares, conforme será comentado no item seguinte.

As células bacterianas no interior do xilema também produzem enzimas que causam escurecimento vascular, percebido pelo descascamento ou corte longitudinal do caule na parte inferior de plantas afetadas (Figura 2). Em alguns casos, percebe-se a formação de raízes adventícias na parte inferior do caule, que é uma reação da planta à falta de água nos órgãos aéreos.

Quadro 1. Esquema da classificação hierárquica de *Ralstonia solanacearum*. Modificado de Fegan e Prior, 2005.

Nível Taxonômico	Equivalência taxonômica	Nomenclatura	Modo de identificação
Espécie	Espécie	Complexo <i>R. solanacearum</i>	“Primers” PCR
Filotipo	Subespécie	Filotipos 1; 2; 3 e 4	Multiplex PCR (Região ITS)
Sequevar	Grupos infra-subespecíficos	Sequevars 1-N	Gene de endoglucanase
Clone	Linhagens clonais		“Fingerprinting” (rep-PCR, RAPD, AFLP, PFGE, etc)



Figura 2. Escurecimento vascular na base do caule de tomateiro afetado pela murcha-bacteriana.

Diagnóstico preciso: murcha-bacteriana versus outras murchas

Plantas de tomate podem murchar pela ação de diferentes doenças, tais como murcha-bacteriana, murcha-de-fusário, murcha-de-verticílio, murcha-de-esclerócio e ataque de nematoides. Para um diagnóstico preciso, é necessário que a planta seja examinada principalmente em sua base e no seu sistema radicular. É necessário que seja também considerada a hipótese de haver mais de um patógeno associado à doença; por exemplo, a infecção por *R. solanacearum* pode ter sido facilitada por ferimentos causados por nematoides.

Como formas de diagnóstico rápido, a presença de massa micelial branca e escleródios na base da planta, acompanhada de podridão radicular, indicam que se trata da murcha-de-esclerócio (*Sclerotium rolfsii*); já a presença de galhas nas raízes é típica do ataque de nematoides-das-galhas (*Meloidogyne* spp.).

Um pouco mais complicado é separar as murchas bacteriana, de fusário e de verticílio. Neste caso, o recomendado é fazer o teste do copo. Este teste é feito cortando-se uma pequena porção (cerca de 5 cm) da parte mais inferior do caule de planta doente, colocando-a em seguida ligeiramente submersa em frasco transparente com água limpa (Figura 3). Pode-se usar um clipe ou outro artifício para fixar o segmento do caule ao frasco. A presença de um filete leitoso saindo do tecido em direção ao fundo do copo indica a presença da murcha-bacteriana. A complementação do diagnóstico da doença é feita em laboratório: colônias típicas de *R. solanacearum* (Figuras 4a e 4b) devem ser obtidas quando suspensão do exsudado leitoso é cultivado em meios de cultura diferencial, como o meio de Kelman (1954). Colônias de *R. solanacearum* podem sofrer variações de formato e cor e ser similares às de outras bactérias

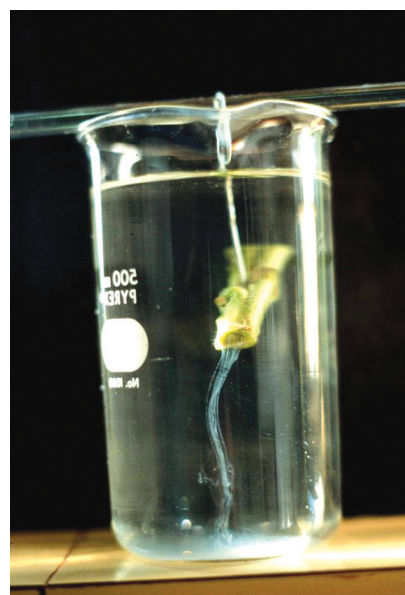


Figura 3. Teste do copo, mostrando exsudação de pus bacteriano em caule de tomateiro afetado pela murcha bacteriana.

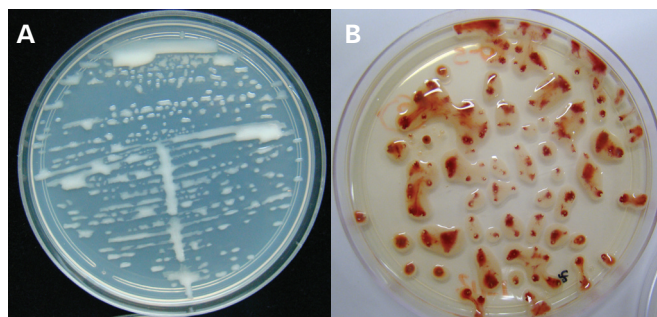


Figura 4. Colônias de *Ralstonia solanacearum* em meio de Kelman sem (A) e com (B) tetrazólio.

contaminantes presentes nos tecidos infectados; por isso, o diagnóstico necessita ser feito por técnico bem treinado, além de ser complementado por testes bioquímicos e, se possível, moleculares, conforme será explicado mais adiante. Para evitar custos desnecessários na identificação de bactérias contaminantes, é recomendável que, antes de se proceder à sua identificação completa, seja obtida cultura monoclonal e, em seguida, realizado teste de patogenicidade em planta de tomate de cultivar sabidamente suscetível à murcha-bacteriana.

Coleta de amostras para envio a laboratórios especializados

Amostras de plantas com suspeita de murcha-bacteriana devem ser enviadas a laboratórios especializados para confirmação do diagnóstico. As amostras devem conter pelo menos cinco segmentos da base do caule, com cerca de 10 a 15 cm na base da planta, cortados logo acima das raízes (Figura 5). As amostras devem ser retiradas de plantas totalmente murchas, porém não secas. Os segmentos de caule devem ser envoltos individualmente em papel de jornal, colocados em caixas de papelão e enviados por serviço rápido de correio.



Foto: Carlos Lopes

Figura 5. Porção do caule de tomateiro que deve ser retirada para testes de diagnóstico da murcha bacteriana.

É importante que as amostras não sejam colocadas em geladeira, pois temperaturas baixas reduzem a população bacteriana e dificultam sua recuperação dos tecidos. Também não devem ser envoltas em sacos de plástico, pois a câmara úmida assim formada acelera a decomposição da amostra, aumentando assim a população de bactérias saprófitas, dificultando o isolamento do patógeno em questão. Amostras enviadas de maneira correta permanecem em boa condição de análise por até sete dias.

Isolamento e armazenamento

O isolamento de *R. solanacearum* é feito a partir da suspensão leitosa que exsuda de porções de segmentos do caule de planta infectada quando colocados em água estéril. Antes de serem removidas essas porções, os segmentos devem ser lavados com detergente sob água corrente, esfregando sua superfície para a remoção de partículas de solo e outras fontes de contaminações externas. Depois de secos, estes devem ser levados à câmara de fluxo laminar onde, com a ajuda de um bisturi esterilizado (flambado), raspa-se a parte mais externa do caule para remoção de parte dos microrganismos contaminantes superficiais não removidos pela lavagem. Com o auxílio de pinça estéril, o caule é então embebido em álcool comercial e ligeiramente flambado. A seguir, uma porção de cerca de 0,5 cm é removida de uma das extremidades com um bisturi estéril. A extremidade cortada é então colocada em contato com solução salina ou água esterilizada contida em tubo de ensaio ou frasco de penicilina. A sustentação da porção do caule em contato com a água pode ser feita com auxílio de palito ou clips, perpendicular à boca do tubo.

Após 5 a 15 minutos, quando a suspensão estiver turva pela presença das células bacterianas, o caule é removido e, com uma alça de repicagem, aproximadamente 10 μ L da suspensão são colhidos e riscados em meio de cultura em placas de Petri. O meio de cultura mais recomendado é o de Kelman (1954) (anexo I), que tem em sua composição o cloreto de trifênil tetrazólio, que confere às colônias “virulentas” de *R. solanacearum*, após dois dias de cultivo a 28°C, uma aparência fluida e esbranquiçada, de forma pouco definida, contendo o centro avermelhado ou róseo (Figura 4). A riscagem

da suspensão deve ser feita de modo que se obtenham colônias isoladas, usadas para produção de inóculo e armazenamento. Lembra-se que o meio de Kelman não é seletivo, e sim auxiliar para diferenciar colônias “virulentas” das “avirulentas”. Colônias “avirulentas”, que aparecem com frequência durante o armazenamento de culturas, são mais vermelhas e circulares, pois produzem pequena massa de polissacarídeos extra celulares (EPS). Como existe variabilidade de tipos de colônias entre isolados de *R. solanacearum*, é necessário certo treinamento para diferenciar as colônias deste patógeno também das colônias de bactérias contaminantes.

Colônias isoladas típicas do patógeno são transferidas para frascos de armazenamento contendo solução salina ou água de poço esterilizada, bem como usadas teste de patogenicidade/virulência pela inoculação em plantas de tomateiro suscetíveis à murcha bacteriana. Para a inoculação, destaca-se o método de ferimento do caule de tomateiro sabidamente suscetível com um alfinete ou palito esterilizado embebido na colônia sob avaliação. Por este método, plantas com três a cinco folhas definitivas (30 a 40 dias após a semeadura) inoculadas com colônias virulentas de *R. solanacearum* murcharão em 3-5 dias, desde que colocadas sob alta umidade e temperatura de 20-40°C. Só devem ser armazenados os isolados que reproduziram sintomas de murcha nas plantas inoculadas em até sete dias de incubação em ambiente propício ao desenvolvimento da doença. Alerta-se para o fato de que temperaturas noturnas abaixo de 19°C podem provocar escapes nas plantas inoculadas, em especial quando plantas mais velhas forem inoculadas.

O armazenamento de uma coleção de trabalho, que deve ser renovada a cada ano, é feito em tubos de ensaio ou tubos para criogenia com tampa de rosca contendo 3 a 5 mL (dependendo do tamanho do tubo) de solução salina ou água esterilizada de poço ou água mineral. A presença de sais permite melhor sobrevivência da bactéria em relação à água destilada.

É importante que a suspensão seja apenas ligeiramente turva, pois alta concentração bacteriana nos tubos pode levar à morte das células pela acidificação da solução. Uma alça de repicagem tocada na colônia, que posteriormente é mergulhada

e agitada na solução contida no tubo, é suficiente. A seguir, agitação intensa em *vortex* é recomendada para garantir a homogeneização da suspensão. Os tubos devem ser claramente identificados e mantidos em temperatura em local fresco, porém nunca sob refrigeração.

O armazenamento em longo prazo, com necessidade de renovação somente após 10 anos, é feito pela suspensão da cultura pura em água com glicerina contida em tubos especiais (criotubos) que são mantidos em *ultra-freezer* a -80°C. A glicerina preserva as células bacterianas da destruição das pelo congelamento. Recomenda-se armazenar pelo menos dois tubos por isolado.

A recuperação do isolado é feita pela riscagem da suspensão bacteriana em placas de Petri com meio Kelman incubadas por 48-72 horas em BOD a 28°C. Ao se retirar o tubo de armazenamento criogênico do *ultra-freezer*, não se deve descongelá-lo. Com uma agulha hipodérmica estéril deve ser feita a raspagem da suspensão congelada do tubo que é posta para derreter no meio de cultivo, para então riscar de modo apropriado. É muito importante que os isolados sejam colocados em sequência em caixas para reduzir o tempo de manuseio. Alternância de congelamento e degelo comprometem a viabilidade das culturas. Outra opção é fazer várias cópias no *ultra-freezer*, marcando os tubos quando forem descongelados, limitando o seu uso a até três descongelamentos.

O armazenamento de *R. solanacearum* em tirinhas de papel de filtro, eficaz para armazenamento de espécies de *Xanthomonas*, não se mostrou adequado para *R. solanacearum*, por apresentar grande proporção de colônias avirulentas na recuperação de vários isolados após um ano de armazenamento a temperatura ambiente (dados não publicados). O armazenamento em suspensão em água a 0°C e -10°C em geladeira provocou a morte das células bacterianas de vários isolados (dados não publicados).

Para o caso específico da Embrapa Hortaliças, a catalogação dos isolados é feita em numeração sequencial (CNPB RS 001, CNPB RS 002, etc.) em caderno de ata, localizado exclusivamente no Laboratório de Fitopatologia, com a indicação de: hospedeira (espécie e, se possível, a cultivar), data da coleta, local de coleta (se possível

com localização GPS), responsável pela coleta, responsável pela coleção, biovar, filotipo e outras observações relevantes, como resultado do teste de patogenicidade, mudanças de numeração etc.

Identificação de biovars

Confirmada a espécie por meio de testes bioquímicos e ou moleculares, é recomendada a identificação do isolado de acordo com a biovar, conforme metodologia proposta por Hayward (1991), que se baseia na utilização diferencial de açúcares (lactose, maltose, celobiose) e álcoois (manitol, dulcitol e sorbitol) (Quadro 2). Embora este se trate de um teste bioquímico, tem sido bastante útil pela correspondência da biovar 2 com a raça 3 (de batata, de climas mais frios). Assim, pode-se concluir, de forma rápida, que isolados que não forem de banana (raça 2), e que não pertencerem à biovar 2 (raça 3), pertencem à raça 1.

Para a realização do teste de biovars, um meio básico, sem fonte de carbono (Anexo I) e com pH neutro é necessário. O meio básico, antes de ser autoclavado, necessita ser dividido em alíquotas. Recomenda-se que este não tenha a adição de ágar e que seja fervido por alguns segundos em forno de micro-ondas, para que os reagentes estejam bem solubilizados e distribuídos. Em erlenmeyers de 200 mL, se adiciona o ágar, para então ocorrer distribuição do meio básico para autoclavagem.

Quadro 2. Determinação de biovars de acordo com as combinações de utilização de dissacarídeos e álcoois (HAYWARD, 1991).

	Biovar*				
	1	2	3	4	5
Utilização dos dissacarídeos					
Celobiose	-	+	+	-	+
Lactose	-	+	+	-	+
Maltose	-	+	+	-	+
Oxidação dos álcoois					
Dulcitol	-	-	+	+	+
Manitol	-	-	+	+	-
Sorbitol	-	-	+	+	-

* Pela inclusão de trealose e inositol, pode-se separar a biovar 2 em 2A e 2T, sendo 2T positivo para ambos.

Após a esterilização e breve esfriamento, o meio é levado para a câmara e fluxo laminar e, com uma seringa e um filtro de 0,22 µm, se filtra o equivalente a 1% da solução final (geralmente 1 grama) de cada carboidrato em solução, agita-se brevemente e então este pode ser distribuído em tubos de ensaio de 15-20mL ou em placas teste de Elisa (Figura 6). Neste ponto, a cor do meio de cultura deve ser verde-oliva, que indica um pH neutro na presença do corante azul de bromotimol.

Para a identificação das biovars, colônias de isolados previamente riscados em placas de Petri em meio de Kelman são re-suspensos em microtubos de 1,5 mL com água mineral autoclavada, de modo a obter-se suspensão turva. A partir desses microtubos, deve-se pipetar 10-20 µL de suspensão de cada isolado nos poços ou tubos que correspondem aos carboidratos distintos, em duplicatas. Incubar os tubos a 28°C por 10-16 dias.

A mudança de cor do meio de cultura deve ser observada a cada dois dias para identificar alguma contaminação, porém a leitura final do resultado deve ser feita a partir de 10 dias. Onde a bactéria se desenvolveu, o meio, originalmente de cor verde-oliva, passa a amarelo (Figura 6), em virtude da sua acidificação pelo crescimento bacteriano. Os poços ou tubos amarelos são considerados positivos e os resultados comparados com o Quadro 2.

Identificação molecular

Os isolados obtidos de plantas sintomáticas, com teste de patogenicidade positivo, independente da presença de colônias típicas ou não, devem

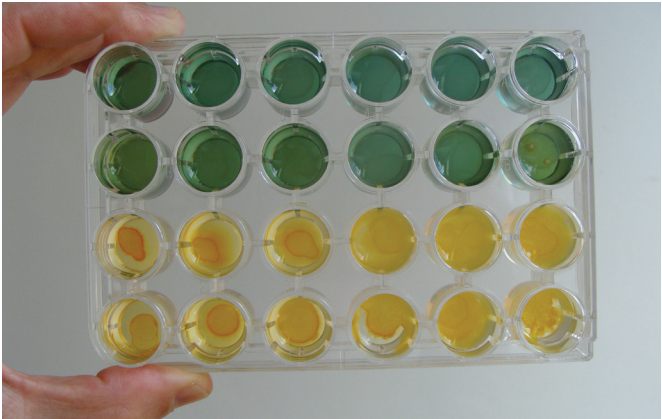


Foto: Carlos Lopes

Figura 6. Placa de ELISA para teste de biovars de *Ralstonia solanacearum*. Poços amarelos indicam reação positiva.

ter sua identidade confirmada por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR) com os iniciadores (*primers*) específicos 759/760 (OPINA et al., 1997), conhecidos pelos seu alto grau de especificidade e baixos falsos positivos (Quadro 3).

A etapa precedente à PCR baseia-se na extração de DNA, realizada a partir de diferentes protocolos disponíveis na literatura, como a metodologia de Mahuku (2004), descrita abaixo. Kits de extração de ácidos nucleicos são recomendados devido à simplicidade e alta qualidade do DNA extraído, porém algumas vezes estão associados à baixas concentrações de material obtido.

Extração de DNA (Segundo a metodologia de Mahuku - 2004)

Colônias características de *R. solanacearum* são repicadas em meio Kelman sólido e incubadas a 28°C por 48 h. As colônias são raspadas e armazenadas em microtubos de 1,5 mL com água Milli-Q e congeladas até o processo de extração.

Para a extração de DNA, as colônias são descongeladas, centrifugadas por 15 min a 10.000 rpm para o descarte da água e, em seguida, são adicionados 200 µL de TE, 30 µL de SDS (20%) e 10 µL de Proteinase K, com homogeneização por meio de um vortex e 40 min em banho maria (65°C). São adicionados 250 µL de acetato de amônio 7,5 M, com nova homogeneização vortex e manutenção a -20°C por 10 min. A suspensão é então centrifugada por 20 min a 13.000 rpm e o sobrenadante (~400 µL) transferido para um novo tubo. O mesmo volume é adicionado de isopropanol e incubado à -20°C por 1 a 2 horas. Centrifuga-se

por 20 minutos a 13.000 rpm e o sobrenadante é descartado, seguido de uma lavagem com 800 µL de etanol 70%. Após descarte do etanol, o *pellet* é seco, deixando os tubos com a tampa aberta “descansando” sobre um papel toalha para posterior adição de 70 µL de Tris-EDTA (10mmol/L Tris-HCl pH 8,0; 0,5 mol/L EDTA) com RNase (1mg/mL). O DNA foi armazenado à temperatura de -20°C até o momento de sua utilização.

Reações de PCR

A identificação em filotipos é feita por meio de uma reação de PCR multiplex com os *primers* Nmult, conforme indicado por Fegan e Prior (2005) (Quadro 3). A PCR multiplex é uma reação que envolve o uso de mais de um par de *primers*. O programa utilizado na PCR foi: 96°C por 5 minutos para desnaturação inicial, seguido de 30 ciclos de: 94°C por 15 segundos; 59°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos; por fim uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Essa amplificação usa cinco *primers* que amplificam a região do 16S do genoma da bactéria. A reação gera fragmentos de tamanhos diferentes para cada filotipo: 114 pbs para filotipo I, 372 pbs para filotipo II, 91 pbs para filotipo III e 213 pbs para o filotipo IV (Figura 7). É possível também a inserção dos *primers* 759/760 diretamente neste PCR multiplex para economizar etapas na identificação de isolados. Concentrações dos reagentes para a reação de PCR se encontram no Anexo II.

Eletroforese

Para análise dos produtos de amplificação obtidos pela técnica de PCR, é necessária a realização da eletroforese, utilizando um corante de ácidos

Quadro 3. Iniciadores (*primers*) utilizados na identificação da espécie e dos filotipos de *Ralstonia solanacearum*.

Primers	Sequência	Referência
Universal		
759	5'-GTC GCC GTC AAC TCA CTT TCC-3'	Opina et al., 1997
760	5'-GTC GCC GTC AGC AAT GCG GAA TCG-3'	Opina et al., 1997
Filotipos		
Nmult: 21:1F	5' -CGT TGA TGA GGC GCG CAA TTT- 3'	Fegan e Prior, 2005
Nmult: 21:2F	5' -AAG TTA TGG ACG GTG GAA GTC- 3'	Fegan e Prior, 2005
Nmult: 23:AF	5' -ATT ACS* AGA GCA ATC GAA AGA TT- 3'	Fegan e Prior, 2005
Nmult: 22:InF	5' -ATT GCC AAG ACG AGA GAA GTA- 3'	Fegan e Prior, 2005
Nmult: 22:RR	5' -TCG CTT GAC CCT ATA ACG AGT A- 3'	Fegan e Prior, 2005

nucleicos como SybrSafe®, GelRed® ou brometo de etídio. Um marcador que permita a identificação do tamanho dos fragmentos deve ser usado, como o 1kb Plus da Invitrogen®, recomendado pela facilidade de uso e tamanho de fragmentos adequados para esta reação. Os *primers* 759/760 geram um fragmento de 282 pbs para isolados de *R. solanacearum*.

Para eletroforese, recomenda-se o uso de uma cuba de corrida horizontal com gel de agarose na concentração 1% para a PCR com os *primers* 759/760 e 2% com os *primers* Nmult. O tampão de corrida para a cuba deve ser T.E (Tris, EDTA) ou T.B.E (tris, boro, EDTA) e o corante brometo de etídio na concentração final de 1 µg/mL. Correr uma alíquota de 10-20 µL da reação no gel para uma melhor visualização. A voltagem da cuba deve ser regulada de acordo com a fonte usada; normalmente é recomendada a voltagem de 80 V, suficiente para distribuir bem os fragmentos amplificados. A fonte deve ser desligada quando o corante azul estiver cerca de 2 cm de distância do final do gel.

Sequevares

A identificação das sequevares exige um conhecimento mais avançado de biologia molecular, pois essa categoria requer a amplificação do gene da endoglucanase (*egl*), purificação do fragmento, sequenciamento e análise filogenética da sequência, comparando com os isolados de referência de cada sequevar. As sequevares foram propostas juntamente dos filotipos (FEGAN e PRIOR, 2005), como categoria inferior a estes. Atualmente, existem mais de 50 sequevares relatadas. Essa classificação possibilita mostrar a variabilidade presente dentro

do complexo da espécie *R. solanacearum*. Entretanto, tem se mostrado pouco útil em termos práticos por se relacionar precariamente com características epidemiológicas da murcha-bacteriana.

Referências

- BUDDENHAGEN, I.; SEQUEIRA, L.; KELMAN, A. Designation of races of *Pseudomonas solanacearum*. **Phytopathology**, v. 52, p. 726, 1962. Resumo.
- FEGAN, M.; PRIOR, P. How complex is the “*Ralstonia solanacearum* species complex”? In: ALLEN, C.; PRIOR, P.; HAYWARD, A. C. (Ed.). **Bacterial Wilt Disease and the *Ralstonia solanacearum* Species Complex**. Saint Paul: APS Press, 2005. p. 449-461.
- HAYWARD, A. C. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 29, p. 65-87, 1991.
- HAYWARD, A.C. The hosts of *Pseudomonas solanacearum*. In: Hayward AC, Hartman GL (Ed.) **Bacterial wilt: the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum***. CAB International, Wallingford, 1994. p. 9-24.
- KELMAN, A. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 44, p. 693-695, 1954.
- LOPES, C. A. **Murchadeira da batata**. Itapetininga: Associação Brasileira da Batata, 2005. 68 p.
- LOPES, C. A. **Murcha-bacteriana ou murchadeira: uma inimiga do tomateiro em climas quentes**. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2009. (Embrapa Hortaliças. Comunicado Técnico, 69). Disponível em: <http://bbeletronica/versaomodelo/html/2009/cot/cot_67.shtml> Acessado em: 10 set. 2012.
- MAHUKU, G. S. A simple extraction method suitable for PCR-Based analysis of plant, fungal and bacterial DNA. **Plant Molecular Biology Society Reporter**, v. 22, p. 71-81, 2004.
- OPINA, N.; TAVNER, F.; HOLLOWAY, G.; WANG, J. F.; LI, T. H.; MAGHIRANG, R.; FEGAN, M.; HAYWARD, A. C.; KRISHNAPILLAI, V.; HONG, W. F.; HOLLOWAY, B. W.; TIMMIS, J. N. A novel method for development of species and strain-specific DNA probes and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum* (formerly *Pseudomonas solanacearum*). **Asia Pacific Journal of Molecular Biology Biotechnology**, v. 5, p.19-30, 1997.

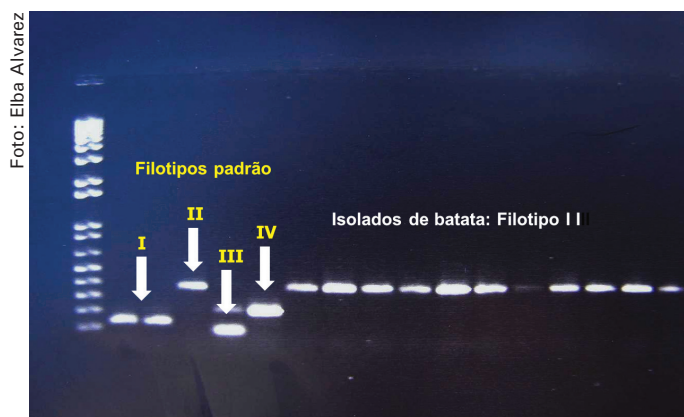


Figura 7. Gel de eletroforese indicando os quatro filotipos de *Ralstonia solanacearum*.

Anexo I

Meio Kelman ou CPG (Para 1 litro de água)

Caseína hidrolizada	1,0 g
Peptona	10,0 g
Glicerol	5,0 g
Ágar	17,0 g

O cloreto de trifetil tetrazólio deve ser preparado a partir de uma solução estoque a 1 % em água destilada, que deve esterilizada por filtração com filtros de 0,22 μm , e depois armazenada em geladeira em frasco escuro ou coberto com papel alumínio. Para cada litro de meio de cultura autoclavado, adicionar 5 mL da solução estoque. O meio deve estar com temperatura de aproximadamente 55°C, que pode ser percebida quando o meio de cultura já não queimar ao encostar o erlenmeyer nas costas da mão.

Meio básico para diferenciação de biovars (para 1 litro de água)

$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	1,0 g
KCl	0,2 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 g
Peptona	1,0 g
Azul de bromotimol	80,0 mg
Ágar (adicionar o ágar somente nas alíquotas)	3 mg/mL

Solubilizar bem todos os reagentes por aquecimento do meio e distribuir 100 mL de meio em erlenmeyers de 250 mL. Autoclavar o meio básico após o seu esfriamento até uma temperatura agradável ao toque. Diluir os carboidratos em aproximadamente 5 mL de água destilada e filtrar usando um filtro de 0,22 μm , já depositando nos erlenmeyers respectivos, de modo a obter concentração final de 1 % de cada uma das fontes de carbono. Realizar todo o procedimento sob câmara de fluxo laminar para evitar a contaminação dos meios.

Após agitar o meio de cultura para homogeneizar a suspensão, deve-se pipetar 5 mL do meio básico, já contendo cada carboidrato, para tubos de ensaio pequenos com tampa de rosca 2 mL ou em placas de cultura de tecidos com poços grandes (Figura 6). Identificar os tubos com os nomes dos carboidratos e armazenar a 4°C até uso.

Para cada isolado a ser analisado, pipetar 10-50 μL da suspensão, preparada em micro tubos usando água mineral autoclavada, no tubo ou poço correspondente da placa. Em seguida, Incubar os tubos ou placas por 7-14 dias a 28°C.

Anexo II

Reação de PCR para confirmação da espécie *Ralstonia solanacearum* (Opina et al. 1997).

Reagentes	Concentração do estoque	Concentração de uso	Vol x 1 (μL)	Vol x n
Tampão da Taq	10x	1X	2,5	
MgCl ₂	50 mM	1 μM	2	
dNTPs	10 mM	0,22 μM	0,625	
759	10 mM	0,4 μM	1	
760	10 mM	0,4 μM	1	
Taq	5 U/μL	2 U	0,2	
H ₂ O	-	-	15,675	
DNA	-	-	2	

*Multiplicar os valores do “Vol x 1” pela quantidade de reações para saber o volume necessário de cada reagente.

Reação de PCR multiplex com os *primers* Nmult (Fegan & Prior, 2005) para identificação de filotipos de *Ralstonia solanacearum* e confirmação da etiologia.

Reagentes	Concentração do estoque	Concentração de uso	Vol x 1 (μL)	Vol x n
Tampão da Taq	10x	1x	2,5	
MgCl ₂	50 mM	1,5 mM	0,75	
dNTPs	10 mM	0,2 mM	0,5	
Nmult 21:1F	10 mM	0,24 μM	0,6	
Nmult 21:2F	10 mM	0,24 μM	0,6	
Nmult 23:AF	10 mM	0,72 μM	1,8	
Nmult 22:InF	10 mM	0,24 μM	0,6	
Nmult 22:RR	10 mM	0,4 μM	1	
759	10 mM	0,16 μM	0,4	
760	10 mM	0,16 μM	0,4	
Taq	5 U/μL	2 U	0,4	
H ₂ O	-	-	13,45	
DNA	-	-	2	

*Multiplicar os valores do “Vol x 1” pela quantidade de reações para saber o volume necessário de cada reagente.

Comunicado Técnico, 92

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na
Embrapa Hortaliças
Rodovia BR-060, trecho Brasília-Anápolis, km 9
C. Postal 218, CEP 70.351.970 – Brasília-DF
Fone: (61) 3385.9000
Fax: (61) 3556.5744
E-mail: cnph.sac@embrapa.br

1ª edição

1ª impressão (2013): 1.000 exemplares

Comitê de Publicações

Presidente: Warley Marcos Nascimento

Editor Técnico: Fábio Akiyoshi Suinaga

Supervisor Editorial: George James

Secretária: Gislaíne Costa Neves

Membros: Mariane Carvalho Vidal, Jadir Borges Pinheiro, Ricardo Borges Pereira, Ítalo Moraes Rocha Guedes, Carlos Eduardo Pacheco Lima, Marcelo Mikio Hanashiro, Caroline Pinheiro Reyes, Daniel Basílio Zandonadi

Expediente Normalização bibliográfica: Antonia Veras
Editoração eletrônica: André L. Garcia